

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-327598

(43)Date of publication of application : 17.11.1992

(51)Int.Cl. C07K 13/00
C12N 15/12
// C12P 21/02
(C12P 21/02
C12R 1:19)

(21)Application number : 03-095285

(71)Applicant : SHIONOGI & CO LTD

(22)Date of filing : 25.04.1991

(72)Inventor : IMURA HIROO
NAKAO ICHIKAZU
NAGATA KIYOSHI

(54) HUMAN C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel peptide useful as an agent for the detection and determination of rat C-type natriuretic peptide(CNP) and various reagents, etc., from a human genom DNA library by using the DNA sequence of the CNP as a probe.

CONSTITUTION: A human genom DNA library prepared by using a bacteriophage vector is screened by plaque hybridization using a DNA fragment of a rat C-type natriuretic peptide (rat CNP) as a probe to select a positive clone and separating the DNA from the clone by conventional process. The DNA is treated with restriction enzyme and linked with a manifestation vector to prepare a recombinant DNA containing a DNA coding a human C-type natriuretic peptide (human CNP). The recombinant DNA is introduced into E.coli and the obtained transformant is cultured to obtain a human CNP having the amino acid sequence from the 74th aspartic acid to the 126th cysteine of the sequence of formula.

Val Ala Asp Ser Thr Ileu Arg Met Asn Ala Asp Leu Ser
1 5 10
Asp Asp Phe Val Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
Glu Ser Leu Ser Ser Asp Arg Thr Ser Ser Ala Asp Ser Thr
65 70 75 80 85 90 95 100 105 110
Val Asp Phe Asp Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
115 120 125 130 135 140 145 150 155 160
Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
165 170 175 180 185 190 195 200 205 210
His Asp Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
215 220 225 230 235 240 245 250 255 260
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
265 270 275 280 285 290 295 300 305 310
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
315 320 325 330 335 340 345 350 355 360
Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
365 370 375 380 385 390 395 400 405 410
Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
415 420 425 430 435 440 445 450 455 460
Ser Asp Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
465 470 475 480 485 490 495 500 505 510
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
515 520 525 530 535 540 545 550 555 560
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
565 570 575 580 585 590 595 600 605 610
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
615 620 625 630 635 640 645 650 655 660
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
665 670 675 680 685 690 695 700 705 710
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
715 720 725 730 735 740 745 750 755 760
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
765 770 775 780 785 790 795 800 805 810
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
815 820 825 830 835 840 845 850 855 860
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
865 870 875 880 885 890 895 900 905 910
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
915 920 925 930 935 940 945 950 955 960
Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
965 970 975 980 985 990 995 1000

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-327598

(43) 公開日 平成4年(1992)11月17日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		7731-4H		
C 1 2 N 15/12	Z N A			
// C 1 2 P 21/02		8214-4B		
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 未請求 請求項の数6(全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平3-95285

(22) 出願日 平成3年(1991)4月25日

(71) 出願人 000001928

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(72) 発明者 井村 裕夫

京都府京都市左京区一乗寺北大丸町58-2

(72) 発明者 中尾 一和

京都府京都市西京区大枝北斎町4-1-2

(72) 発明者 永田 清

兵庫県神戸市垂水区小塚山6-10-16

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ヒトC型ナトリウム利尿ペプチド

(57) 【要約】

【構成】 ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含む53個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該53個のアミノ酸を含む128個のアミノ酸でなるプレプロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列が提供される。上記DNA配列は、ヒトゲノムDNAライブラリーから、ラットCNPのDNA配列をプローブとして使用して得られた。

【効果】 ヒトCNPもしくはそのDNA配列を利用して、検体中のCNPの検出、測定がなされ、あるいはCNPを含む各種試薬などが調製され得る。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の74位のアスパラギン酸から126位のシステインまでのアミノ酸配列を有するヒトC型ナトリウム利尿ペプチド。

【請求項2】 配列番号1の1位のメチオニンから126位のシステインまでのアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のヒトC型ナトリウム利尿ペプチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載のヒトナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項4】 配列番号1の622位のGから687位のTまでのDNA配列でなる、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項5】 配列番号1の1位のGから2473位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項6】 配列番号2の1位のGから2917位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするヒトゲノム由来のDNA配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含む53個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該53個のアミノ酸を含む126個のアミノ酸でなるプレプロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列に関する。

【0002】

【従来の技術】 最近ブタの脳から新規なナトリウム利尿ペプチドが単離された。この新規なペプチド群はC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)と呼ばれる。ブタCNPには、1個の分子内ジスルフィド架橋(アミノ酸17残基でなる環状構造を形成する)を含む22個のアミノ酸残基を有するペプチド(ブタCNP)と、該CNPのN末端が延長されて合計で53個のアミノ酸残基を有するペプチド(ブタCNP-53)とがある。上記CNPの環状部分は、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)および脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)と高い相同性を有する。CNPはANPおよびBNPと同様に、心臓血管動脈の平衡の調節に関与すると考えられるが、培養された血管平滑細胞中でナトリウム利尿ペプチドのセカンドメッセンジャーであるサイクリックGMPの産生をより高めることから、ANPおよびBNPとは異なる機能を有することが示唆される。

【0003】 Tawaragiら(Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 172, No. 2, 1990)は、上記CNP-53のN末端配列およびC末端をもとにPCR反応を利用して、ブ

2

タCNPをコードするゲノムDNAおよびcDNAを単離している。これらのDNAの解析から126個のアミノ酸でなるプレプロCNPの存在が明らかにされている。FEBS LETTERS, Vol. 276, 209-213 (1990)では、ラット脳cDNAライブラリーを用いて、ブタCNP-53のN末端配列をもとにPCR反応を行い、ラットCNPのDNA配列が明らかにされている。このDNA配列からラットCNPにおいても22個のアミノ酸残基を有するペプチド(ラットCNP)、53個のアミノ酸を有するペプチド(ラットCNP-53)、および126個のアミノ酸残基を有するペプチドの存在が明らかとなった。ブタCNPおよびラットCNPのコード領域のDNA配列を配列表の配列番号3および4にそれぞれ示す。これらの配列の比較から明らかのように、コード領域は約90%の相同性を有し、対応するアミノ酸配列については、それぞれのCNP-22は完全に一致することがわかる。

【0004】 上記のように、ブタおよびラットのCNPについてのいくつかの情報が明らかにされているが、ヒトについてはこのようなCNPの存在およびDNA配列についての知見は得られていない。ヒトCNPの存在もしくはDNA配列が明らかになれば、これを各種試薬、薬剤などに利用し得ると考えられる。

【0005】

【発明の目的】 本発明の目的は、ヒト由来のC型ナトリウム利尿ペプチド(ヒトCNP)のDNA配列を明らかにすることである。

【0006】

【発明の構成】 発明者らはヒトゲノムDNAライブラリーをラットCNPのcDNA断片を用いたスクリーニングに供し、ヒト由来のCNPのDNA断片を得て、その配列の決定を行うことにより、本発明を完成するに至った。

【0007】 本発明のヒトCNPは配列番号1の74位のアスパラギン酸から126位のシステインまでのアミノ酸配列を有する。

【0008】 本発明のヒトCNPはまた、配列番号1の1位のメチオニンから126位のシステインまでのアミノ酸配列を有する。

【0009】 本発明のDNA配列は、上記ヒトCNPをコードする。

【0010】 本発明のDNA配列は、配列番号1の622位のGから687位のTまでのDNA配列でなる、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

【0011】 本発明のDNA配列はまた、配列番号1の1位のGから2473位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

【0012】 本発明のDNA配列はまた、配列番号2の1位のGから2917位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

3

【0013】本発明のヒトCNPのDNA配列の同定、およびヒト脳におけるCNP様活性の検出を以下に示す。

【0014】(1) ラットCNPをコードするcDNA断片の調製

ラットの脳から細胞の全RNAを常法により抽出する。次いで既知のラットCNPのDNA配列(FIBS LETTERS, 前出)のコード領域の5'末端付近の配列を含む断片(プライマー)および3'末端付近の配列に相補的な配列を含む断片(アンチセンスプライマー)を合成する。プライマーおよびアンチセンスプライマーのDNA配列を配列番号5および6にそれぞれ示す。これらのプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いてPCR反応を行う。得られたPCR産物を適当な制限酵素で切断し、ラットCNPのcDNAの全ペプチドをコードする領域に対応する378個の塩基対を有するDNA断片を得る。所望のDNA断片が得られたことは配列分析により確認される。

【0015】(2) ヒトゲノムDNAライブラリーのスクリーニングおよびヒトCNPをコードするDNAの配列決定

(1)項で得られたラットcDNA断片をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、約15kbpの遺伝子断片(λHCNP14)を得る。この断片をBamHIおよびSmaIで消化することにより得られる断片(約3.0kbp)をサブクローニングし、ジデオキシ法により配列の決定を行う。このようにして得られた2917bpのDNA配列および推定されるヒトCNPのアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。イントロンと推定される部分を除くヒトCNPのcDNAの配列を配列番号1に示す。

【0016】(3) ヒトCNPのDNA配列の解析
配列番号2に記載のように、ヒトCNPのDNA配列は、少なくとも2個のエキソンと1個のイントロンとを有すると考えられる。イントロンは400番目のGから843番目のGまでであると考えられる。このイントロンの位置は、このゲノムDNAの配列とラットCNPのcDNA配列とを比較することにより決定された。エキソンとイントロンとの境界には、スプライシングドナー(AAG/GTGGGT; 397~405番目の塩基)およびスプライシングアクセプター(CAG/G; 841~844番目の塩基)が存在する。RNAポリメラーゼIIの結合に関与しているTATAAA配列(TATAボックス)は134~139番目の塩基の位置にある。さらに、逆向きのCCAATボックス(Yボックスのコア配列)、2個のGCボックス、およびサイクリックAMP応答要素(CRE)様配列が、5'隣接領域に存在する。このようなCCAATボックスおよびサイクリックAMP応答要素様配列は、ANPおよびBNPの上流配列には存在しない。CNPの開始コドン(ATG)は

4

310~312位に存在する。第1のエキソンは、5'非翻訳領域、シグナルペプチド(最初の疎水性アミノ酸23個)をコードするDNA配列、および成熟ペプチドの最初のアミノ酸7個をコードするDNA配列を有する。第2のエキソンは、CNPの成熟ペプチドの8番目のアミノ酸であるバリンをコードするGTCから終止コドンであるTAGまでのDNA配列を含み、さらに、3'非翻訳領域を含む。このDNA配列においては、3'非翻訳領域に、典型的なポリアデニル化シグナル(AATAAA)が翻訳終止コドンの約1800bp下流までの領域には見出されなかった。このことにより、ヒトCNP遺伝子は長い3'非翻訳領域を有すること、および/または3'非翻訳領域に第2のイントロンが存在することが示唆される。ちなみに、ANPおよびCNPについては、3個のエキソンと2個のイントロンとを有し、第3のエキソンはC末端延長コード領域(CNPには存在しない)を有する。

【0017】上記遺伝子構造から、ヒトCNPとしては配列番号1に示すように、1番目のアミノ酸であるMetから126番目のCysまでの126アミノ酸でなるプレプロ型のCNP、74番目のAspから126番目のCysまでの53アミノ酸でなるCNP(ヒトCNP-53)、および105番目のGlyから126番目のCysまでの22アミノ酸でなるCNP(ヒトCNP)が存在することがわかる。上記CNP-126の最初の23アミノ酸残基は疎水性に富むことからシグナルペプチドであると考えられる。23番目のAlaと24番目のLysとの間で開裂が起こりプロCNPが生じると考えられる。

【0018】上記3種のアミノ酸配列を、配列番号3に記載のブタCNPのDNA配列に対応するアミノ酸配列、および配列番号4に記載のラットCNPのDNA配列に対応するアミノ酸配列とそれぞれ比較すると、CNPについては、そのアミノ酸配列がすべて同一であることがわかる。CNP-53については、ヒトとラットとで2個、そしてヒトとブタとでも2個のアミノ酸の相違がある。プレプロCNPについては、ヒトとラットとで8個、そしてヒトとブタとでは5個のアミノ酸の相違がある。それぞれのDNA配列(開始コドンからTAGまで)を比較するとヒトとラットとでは94%(CNP)、94%(CNP-53)および89%(プレプロCNP)の相同性があり、ヒトとブタとでは95%(CNP)、95%(CNP-53)、および93%(プレプロCNP)の相同性がある。特に、5'隣接領域、およびシスエレメントの配列がヒトおよびブタCNPにおいてよく保存されており、CNPのDNA配列は、ナトリウム利尿ペプチド群のなかで最も保存性が高いことがわかる。

【0019】(4) CNP様活性の検出方法
ヒトCNP様活性は、上記DNA配列に基づいてCNP

ペプチドを合成し、これを用いて得られる抗血清を用いた免疫反応により検出され得る。例えば、CNPあるいは[Tyr⁶]-CNP (CNPのN末端にTyrが結合したペプチド)を固相法により化学合成し、これをマウスに投与して得られる抗血清を用いてラジオイムノアッセイ(RIA)を行うことにより検出される。RIAは、ANPを検出するためのRIAの方法(J. Clin. Invest., 81:1962-1970)に準じて行われ得る。上記方法によるCNP様活性において、最小検出限界は2.0 fmol/チューブであった。CNP様活性のα-ヒトANPおよびヒトBNPに対する交叉反応性は、それぞれ0.2%および0.01%未満であった。50%結合阻止濃度(CNP抗体と標識CNPとの結合が50%阻止されるCNPの濃度)は30 fmol/チューブであり、変動係数は、同じ系で同日に続けてこの実験を9回行った場合が8.7%、そして同じ系を作成して別々の日に8回にわたり行ったところ9.1%であった。

【0020】同様に、ヒトANPについてのRIAにおいて、ヒトBNPおよびCNPとの交叉反応性はそれぞれ0.01%未満であり、BNPについてのRIA(J. Clin. Invest., 印刷中)において、ヒトα-ANPおよびCNPとの交叉反応性は、それぞれ0.01%未満および1%未満であった。

【0021】(5)ヒト脳におけるCNP様活性の検出
ヒトの脳の抽出物を逆相高速液体クロマトグラフィーにかけ、各フラクションについて、CNP様活性を、上記(4)項のRIAの方法により調べた。図1に得られたCNP様活性を示す。CNPを化学合成し、同一条件でHPLCにかけたところ保持時間4.8分で溶出されたため、これがCNPに相当するピークであると考えられる。6.6分に溶出されたフラクションのピークは、既知のプタCNPとの比較からCNP-53であると考えられる。図1における破線はCNPの検出限界を示す。

【0022】次にヒトの脳の異なる領域からの抽出物のそれぞれについて、上記(4)項のRIAの方法によりCNP様活性を調べた。ANP様活性およびBNP様活性についても同様に調べた。その結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

脳の部位	CNP様活性	ANP様活性	BNP様活性
大脳皮質	0.81	< 0.07	< 0.06
視床	2.80	< 0.07	< 0.06
視床下部	4.02	0.13	< 0.06
中脳	3.78	< 0.07	< 0.06
延髄	< 0.4	0.18	< 0.06
小脳	2.78	0.08	< 0.06
小脳(皮質)	< 0.85	0.07	< 0.06

(単位: pmol/g組織湿重量)

【0024】表1から、ヒト脳内におけるCNP様活性のレベルはANP様活性及びBNP様活性よりも1桁高く、このことからCNPは主として脳内で生じる主要な

ナトリウム利尿ペプチドであると考えられる。CNP様活性は、特に、視床下部、中脳、視床および延髄において高いレベルであることがわかる。これに対して、ヒトの心臓およびプラズマからは高レベルのCNP様活性が検出されない。従って、CNPは、BNPがヒトおよびラットの心室から分泌されるのとは全く異なる組織特異的発現性を有することがわかる。

【0025】上記のように、CNPのDNA配列は、ANPおよびBNPのDNA配列には存在しないCCAA TボックスおよびサイクリックAMP応答要素様配列を有する。このことはCNPの発現の制御機構がANPおよびBNPのそれとは異なっていることを示唆する。最近、Andersonらにより、2個並んだCRE配列と、CCAATボックスと、その間の連結調節要素とよばれる配列(シスエレメント)とが、糖タンパクα-サブリット遺伝子の組織特異的発現を増大させることが報告された(J. Biol. Chem. 265:21876-21880)。発明者らは、CNP様活性は、ラット脳下垂体の前葉に最も多く存在することを実験により確かめており、このデータをあわせて考えると、上記シスエレメントは、CNP遺伝子の組織特異的な発現性を付与すると考えられる。

【0026】

【実施例】以下に本発明を実施例につき説明する。

【0027】(実施例1)

(1)ラットCNPをコードするcDNA断片の調製
ラットの脳から細胞の全RNAを4Mグアニジンチオシアネートバッファーを用いて抽出した。次に、下記のセンスプライマーAおよびアンチセンスプライマーB(配列番号5および6に示される)を化学合成した。

【0028】センスプライマーA

ATATGAGCTCATGCACCTCTCCAGCTGATC

アンチセンスプライマーB

TAGCGTCGACTAAGATCCAGACCCGCTCAT

プライマーAは、既知のラットCNPのDNA配列(FEBS LETTERS, 前出)のコード領域の5'末端付近の配列であり、プライマーBは3'末端付近の配列に相補的な配列であり、それぞれS_{ac}IおよびS_{al}Iで制限部位が付加されている(下線部)。モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Bethesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, MD)を用いて、オリゴ(dT)プライミングによって、5μgの全RNAの逆転写を行った後、得られた一本鎖のcDNAを標準的な条件下でPCR反応に供した。増幅後、そのPCR産物をS_{ac}IとS_{al}Iとで消化して、調製用の1.0%アガロースゲル電気泳動により分離した。その分離されたDNA断片を、増幅のためにpUC119またはBlue-script(Stratagene, La Jolla, CA)にサブクローニングした。このようにして、ラットCNP cDNAの全ペプチドをコードする領域に対応する378bp

の断片が得られた。このことは上記配列を分析することにより確認された。

【0029】(2) ヒトゲノムライブラリーのスクリーニングおよびヒトCNPをコードするDNA配列の決定
ヒトゲノムDNAライブラリー (Clontech Inc., Mountain View, CA) を、ハイブリダイゼーション用プローブとしてPCRで増幅された上記ラットCNP cDNA断片を用いて次のようにスクリーニングした。

【0030】まず、バクテリオファージ入EMBL-3ベクターを用いて作成された上記ヒトゲノムDNAライブラリーを、*E. coli* LE392株に導入した。これをColony/Plaque Screenフィルター (Du Pont, Boston, MA) へ、二本鎖の状態で移した。フィルターと結合したDNAを変性させ、UV照射によって固定した (Stratilinker, Stratagene, La Jolla, CA)。そのフィルターを、50mMトリス塩酸 (pH7.5)、1M NaCl、10%デキストラン硫酸、1% SDS、200μg/ml 酵母tRNA および200μg/ml 剪断サケ精子DNA含有の溶液中で60℃においてプレハイブリダイズした。次に、上記プレハイブリダイゼーション溶液に³²P標識した上記ラットCNP cDNAプローブを加え、この容器を用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの後、そのフィルターを0.5xSSC (1xSSCは0.16MNaCl、0.016Mクエン酸ナトリウム)、0.1% SDSにより、45℃で3回洗浄した。スクリーニングの2段階目において、フィルターを更に厳しい条件のもとで洗浄した (0.2xSSC+0.1%SDSにより、50℃ 3回)。

【0031】約1×10⁶個のクローンをスクリーニングし、9個の陽性のクローンを得た。このクローンは、ヒトANP cDNAプローブおよびヒトBNP cDNAプローブ (J. Clin. Invest. 印刷中; およびJ. Clin. Invest. 83:298-305) と交叉ハイブリダイゼーションを行わなかった。1つのクローン (λHCNP141) 由来で約15kbのヒトCNP遺伝子断片を有するDNAおよび該DNAの約3.0kbのBamHI-SalI消化断片をさらに次のように分析し、配列を決めた。

【0032】上記DNA断片をBluescriptまたはpUC119ベクターへサブクローニングし、ジデオキシ鎖停止法によってDNAの配列決定を行った。二本鎖DNAの両方の鎖を解読することにより上記DNA配列の正しいことが立証された。

【0033】(3) CNP様活性の検出

ヒトの脳および他の臓器は相補的合併症を併わない死体の解剖によって得た。得られた脳およびその他の臓器をただちに液体窒素で凍結し、使用時まで-70℃で保存した。上記臓器からの抽出物を下記の条件により逆相高速液体クロマトグラフィーにかけた。上記HPLCはN

ucleosil 5C₁₈カラム (4.6×150mm, Macherey-Nagel, Duren, Germany) を用い、0.1%トリフルオロ酢酸中でアセトニトリルを20~40%に増加させるリニアグラジエント法で行った。各フラクションについて、「発明の構成」の項で述べた標識CNP抗体を用いたRIAによりアッセイを行い、CNP様活性の測定を行った。その結果を図1に示す。CNPを化学合成し、同一条件でHPLCにかけたところ保持時間4.8分で溶出された。従って、この位置に現れるピークがCNPであると考えられる。保持時間6.6分で溶出されたフラクションのピークは、既知のブタCNPとの比較からCNP-53であると考えられる。図1における破線は、CNPの検出限界を示す。

【0034】次にヒトの脳の異なる領域からの抽出物のそれぞれについて上記と同様のRIAの方法によりCNP様活性を調べた。ANP様活性およびBNP様活性についても同様に調べた。その結果、「発明の構成」の項の表1に示す活性が測定された。この表からヒト脳内におけるCNP様活性のレベルはANP様活性及びBNP様活性よりも1桁高く、このことからCNPは主として脳内で生じる主要なナトリウム利尿ペプチドであると考えられる。CNP様活性は、特に、視床下部、中脳、視床および延髄に高いレベルであることがわかる。

【0035】

【発明の効果】本発明によれば、このように、ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含む53個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該53個のアミノ酸を含む126個のアミノ酸でなるプレプロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列が得られる。これらを用いて検体中のCNPの検出、測定、あるいはCNPを用いた各種試薬、薬剤などが調製可能となる。

【0036】

【配列表】

【0037】

【配列番号:1】配列の長さ:2473

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to genomic DNA

起源:ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号:CAAT signal

存在位置:81..86

特徴を決定した方法:S

特徴を表す記号:GC signal

存在位置:89..94、および101..106

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: T A T A signal

存在位置: 134..139

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: C D S

存在位置: 310..690

特徴を決定した方法: S

配列

GGATCCCTCC GGGGTGGGAT AAGGAGGGG AGCCCCCGG GCCCCCTCC GGGCCTCGG 60
 GGGCCCGGT GGTGTGTGTC ATTGGCCCG GGGCCCGGT GGGCGGAGG ATGACATCAG 120
 GGGCAGGTTG GATTATAAG GCGCGAGCAG ATCAGCGGC TCAGAGGCA CCCAGCUGG 180
 GCGCGCAGC ACTGGGACCC TGCTCGGCT GCAGCCAGC CAGCCTGCTC GGCATCCCC 240
 TGCTGCTCTG CCGCGGACG TGGCGGCTT CGCTGCTGCT GGTGTGCGG CTTGAGCCG 300
 AGCGGCAGC ATG CAT CTC TCC CAG CTG CTG GCG TGC GCG CTG CTG CTC 348
 Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu
 1 5 10
 AGC CTC CTC TCC CTC CGG CCC TCC GAA GGC AAG CCC GAG GCG CCG CCG 386
 Thr Leu Leu Ser Leu Arg Pro Ser Gln Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro
 15 20 25
 AAG GTC CCG CGA ACC CCG CCG GCA GAG GAG CTG GCC GAG CCG CAG GCT 444
 Lys Val Pro Arg Thr Pro Pro Ala Gln Gln Leu Ala Gln Pro Gln Ala
 30 35 40 45
 GCG GGC GGC GGT CAG AAG AAG GGC GAC AAG GCT CCC GGG GCG GGC 492
 Ala Gly Gly Gly Gln Lys Lys Gly Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly
 50 55 60
 GCU AAT CTC AAG GGC GAC CGG TCG CGA CTG CTC CGG GAC CTG CGC GTG 540
 Ala Asn Leu Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val
 65 70 75
 GAC ACC AAG TCG CGG GCA GCG TGG GGT CGC CTT CTG CAA GAG CAC CCC 588
 Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Gln His Pro
 80 85 90
 AAC GCG GGC AAA TAC AAA GGA GGC AAC AAG AAG GGC TTG TCC AAG GGC 636
 Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly
 95 100 105
 TGC TTC GGC CTC AAG CTG GAC CGA ATC GGC TCC ATG AGC GGC CTG GGA 684
 Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
 110 115 120 125
 TGT TAGTGGGCG CCCTTGGGCG GCGGTGAGTA CGGCCACCTC GAGGCCAGC 732
 Cys
 126
 CCCAGCCTCG CCGGGACCG CCGCGGCGC AGCGGCTTC GGAGGCGCGC GAGCGGCTT 792
 TGTCAAGTT GTGCTAGCG TTTGCCAGC GCGCCCTTTA TTATCCACT TTACAGACAA 852
 AGAAGCGAA GATAAGCTG ATCGGGGAA TTTGGCAAG TCAGAAACGG CTCAGCTTG 912
 TTGAACCCAC CTGGCTTCTT CTGAGAAAG AGAACAAGC TTGCTGTGT CTCACCTACC 972
 CTTGAACCGT AGCTGAAGTA GAGCACTGG CCGCTATTGG CCAGCTGGTG GCGGATTGA 1032
 GAGGAGATCA TGGGTTTGTG GAGCAGAGA AGGAAGGTTA CACCCACAAG TCAGGGGAC 1092
 ATCGATCATC TGTGCGCAC CATGCCCTT GTAGTGAGAG TAGCCCTCTG CTGGCACTGT 1152
 CAGGCGGCTT TCTGCTGGG AACTCCGAT TCTGTCCTT TCTTAACG CAGGCACTGG 1212
 GCAACTGGT CTGTCCAGG TCTGAGGCA GCTGAGCCT GGTGGCTTG GGGGTGAATC 1272
 TCAGTCTGTG TGGCACTATT TCAGGAATA GGAAGACAC TAAAGTAAAT ATTATTGCC 1332
 CCAGCTCGA ACTCAACAG TCCAGAGTC CCTCACCAC CTGTCCCGA CCAACCGGT 1392
 GCTGTGGGT CCGTTTCTG TGTGGGTCT CACCTGACAC TAGGCTGGA AACCTCTGCC 1452
 CTACGCGAC CCGTCCCGG TCGCGGTGG TGGTAATTA CTGCTGAGA GAGCCTCACC 1512
 TCTGCTCTT CCGTCTCTC TATTCTGCT GCTGCGCGT GCGCACTGAA TACATGCCA 1572

11 12
 GCCTGTGACA TTGACASTUA TGTGCGTTAG GATCAGGCTT ACCTGGCTTT CTGCTTTCT 1637
 TGGCTCCAGC TCAGCAGCTG CCACTGCCTG TCCACACCTT TGACTGTGCG ATCCAGGCT 1697
 ACCGGCAAGC TGCTGTCTCC TCCCAGAAA CCTTGTCTAG TGTGGGATCT TCTCCCGGAG 1757
 GAAACAAGAG CGCTGTGCCA GCACACTGTC TCTTTTTTAC AGTACAGAAC ACTTTTTTAC 1817
 AGTTTGTGAA CCGATTTCACC TCTCCATATT GAACAGCTTA AGGGCGAAGT GCTGGGCTAA 1877
 GGGACTCTAG GAGCCACTGC ACCCGGAACA GACTGTGGA AATATTTGTC AATGACCAGA 1937
 GAAACGAGCA CAGCCCTGGCC CATGGCACTC CCACCTGCCC GAGGTTTTAA CCAGTGGCTT 1997
 TGGTCTCTTT GCGGCGAGAC CTCACCTGGC TGTGGGCTTC TCCCGAGTTC TGCAGAGGCT 2057
 GTAGTTGTCT GTGATCTTGA CTCTCCCTTG CACAGGGAGA AGAATGATTC TGACACTTGG 2117
 CGACCAAGCT TCAGTAGCTA CCGTTGGAAT GCGTTTGCTC TCTTCTCTCC TGTCTAAACA 2177
 ACAAGGAGAC GGAGCTGAG GCTTCAAAAT TTCAGTTTGA TTTAAGCATC AAGTTCAAAC 2237
 ITTAGAAGCT GAGCAAAATG TAGTGACTCT CATTGTGTC GTACCTGGAA TGGCGATCTA 2297
 CAGGGGCTTT GTTGTGAGC CTGCTGTCTC GTGCTACCA AGTATGAGCC AAACGGGTGG 2357
 TGAAGATGC TGTGTAGGAG GAATCCACAT TGTTAAGAAT TCTCGACCCC TTTGATCAGG 2417
 GGGTTCAAT AATCTCTAC CAGCTCTCTT AGCATAGATG AACACTTACC GTGGAC 2473

【0038】

【配列番号：2】配列の長さ：2917

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CAAT signal

存在位置：81..85

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：GC signal

存在位置：89..94、および101..106

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：TATA signal

20 存在位置：134..139

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：CDS

存在位置：310..399、および844..1134

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：intron

存在位置：400..843

特徴を決定した方法：S

配列

CGATCTCTCC GGGGTGGAT AAGGAGGGG AGCCCTTCCG GCGCCCTTCC GGGCTGGCC 60
 GGGGCGGCT GCTGTGTGTC ATTGGCCCG GCGCCCGGT GGGCGGAGG ATGACATAG 120
 CGGAGGTTG GATTATAAG GCGGAGGAG AGTCAAGGC TCAGAGGCA CCCAGGCGG 180
 GCGGCGAGC ACTGGGACC TGTCTGCGCT GCGGCCAGC CAGGCTGCTC GGCATGCCC 240
 TGTGTGTCTG CCGCGGAGC TGGCGGCGT GGTGCGGCG GGTGTGCGC CTGAGCCCC 300
 AGCGGACAC ATG CAT CTC TCC CAG CTG CTG GCC TGC GCC CTG CTG CTC 348
 Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu
 1 5 10
 ACG CTG CTC TCC CTC CGG CCC TCC GAA GCC AAG CCC GGG CGG CCG CGG 396
 Thr Leu Leu Ser Leu Arg Pro Ser Gln Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro
 15 20 25
 AAG GTGGGTGCTG TGTGTGGAC GCGAGGCTG GGAGAGCGT GGAAGGCTGG 449
 Lys
 30
 GGGCTTGGAG AATGCGGCGC GCAAGACCA GGAGAGGGG AAGGAGGCG GCTGTCTCT 509
 CCGAGATGG GGTGGGCGAG AGCCGGGGG CCGTGAAGC GCGGATTCCG GGTGCACTT 569
 CTCCAGGCTC GGGAGAATAT CCGCCATCC GCGGCCCCC ACCCCAGTGT GCGTGGCCG 629
 GCGGAGACA AAGGAGGGG AGGGGCTTC GCGAGGAGC GCGGAGGCG GCGCGGTGGC 689
 AGGTGATGC GGGGCCAAGC TGGCCGCGAT CGGTGGGGG GCGTCTGGG TTGGAGGGA 749
 CAGCCCGCC GCGGAGGCG GTGGGCTGG AGCATCAGG TCCCGGTGC TCGAGCGCG 809
 TGTCTCTTA CCGCCCGCT CTTTCTTGG ACAG GTG CCG CGA ACC CCG CCG GCA 864
 Val Pro Arg Thr Pro Pro Ala

13

14

															35	
GAG GAG CTG GGC GAG CCG CAG GCT GCG GGC GGC GGT CAG AAG AAG GGC																912
Glu Glu Leu Ala Glu Pro Gln Ala Ala Gly Gly Gly Gln Lys Lys Gly																
40					45					50						
GAC AAG GCT CCC GGG GGC GGG GGC GCC AAT CTC AAG GGC GAC CGG TCG																960
Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ala Asn Leu Lys Gly Asp Arg Ser																
55					60					65						
CGA CTG CTC CGG GAC CTG CCG GTG GAC ACC AAG TCG CGG GCA GCG TGG																1008
Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp																
70					75					80					85	
GCT GCG CTT CTG CAA GAG CAC CCC AAC GCG CGC AAA TAC AAA GGA GGC																1056
Ala Arg Leu Leu Gln Gln His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala																
90					95					100						
AAC AAG AAG GGC TTG TCC AAG GGC TGC TTC GGC CTC AAG CTG GAC CGA																1104
Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg																
105					110					115						
ATC GGC TCC ATG AGC GGC CTG GGA TGT TAGTGGGGCG CCCCTGGCG																1151
Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys																
120					125					126						
GGGCTGAGTA CGGCCACCC GACGCUAGC CCCAGCCCGG CCGGGACCG CCCGCCGCC																1211
AGCCGCTTC GGAGCGCGC GAGCGGCTT TGCTCAAGTT GTGCTAGGCG TTGCGAGCC																1271
GGCCCTTTA TTATCCCACT TTACAGACAA AGAAAGCGAA GGATAACGTG ATCGGGGAAC																1331
TTTGGCAAGG TCAGAAACGG CTCAGCCTGG TTGAACCCAC CTGGCTTCTT CTGGAGAAGC																1391
AGAAACAGGC TTGGTGGTGT CTCACCCACC CCTGAACCGT AGCTGAACCTA GCAGCACTGG																1451
CCCTATTGG CCAGCTGGTG GGGGGATTGA GAGGAGATCA TGGGTTTGTG GGAGCAGAGA																1511
AGGAAGCTTA CACCCACAAG TCCAGGGGAC ATCGATCATC TGCTGGCCAC CATGCCCTCT																1571
GTAGTGAGAG TAGCCCTCTG CTGGCACTGT CAGGGGCCCT TCTGCCCTGG AACTCCGAT																1631
TCTGTCCCT TCTCTAAACC CAGGCAGTGG GCAAACTGGT CTGTCCAGGG TCTGAGGCA																1691
GTGTCAGCT GGTGCTTGG GGGTGAATC TCAGTCTTG TGGCACTATT TCAGGCAATA																1751
GGAAAGACAC TAAAGTAAAT ATTATTGGC CCAGCCTCGA ACTCAACAGC TCCAGAGTC																1811
CCTCACCAAC CTTGTCCGA CCCAACCGT GCTCTGGCT CGGTTTCTGG TGTGGGTCT																1871
CACCCGKAC TAGGGCTGA AACCTCTGC CTACCGCCAC CCGTGGCGGG TGCGGCTGG																1931
TGGTAATTA CTGCTGCAGA GAGCTCACC TCTCTCTTT CCTCTCTCT TATCTCTCC																1991
GCUTGCTGT GCCACTGAA TAACATCCA GCUTGTGACA TTGACAGTUA TGTGGTTAG																2051
GATLGGHTT ACCGTGCTT CTGCTTTCT TGCTCTAGC TCAGCAGCTG CCACTGCTG																2111
TCCACACCT TGACTGTCC ATCCAGGCT ACGGGCAAGC TGCTGTCTCC TCCCAGAAA																2171
CCCTGTGAG TGTGGATCT TCTCCGGAG GAAACAAGAG CGCTGTCCA GCACATGTC																2231
TCTTTTTC AGTACAGAAC ACTTTTTCAG AGTTTGTGA CCCATTACCC TCTCATATT																2291
GAACAGCTTA AGGGCGAAGT GTTGGCTAA GGCATCTAG GACCACTGC ACCCGAACA																2351
GACTGTGGA AATATTGTG AATGACCAGA GAACCCAGCA CACCTGGCC CATGGCACTC																2411
CCACTGCCC GAGTTTAA CCAGTGGCT TCTCTCTTT GCAGCCAGAC CTCATGGGC																2471
TGTGGGCTC TCCCAGTTC TCAAGGCT GTAGTGTCT GTGATCTGA CTCTCCCTG																2531
CACAGGAGA AGAATGATC TGACACTTGG GGACCAAGCT TCAGTAGCTA CTTTGGAAAT																2591
GGCTTGTCT TCTTCTCTCC TGTCTAAACA ACAAGAGAC GGAGTCTGAG GCTCAAATT																2651
TTAGTTTGA TTTAAGCAT AAGTTCAAAC TTTAGAACCT GAGCAATGT TAGTCACTCT																2711
GAATGTGTC GTACCTGGA TGCAGATCCA CAGGGCTTT GTTCTTGGG CTGGATGTCT																2771
GTGGTACCA AGTATGGCC AAACGGGTGG TGAAGATGC TGTGTAGGAG GAATCCACAT																2831
TGTTAAGAA TCTGACCCC TTTGATCAGG GGGCTTCAAT AATCTCTAC CAGCTCTCTT																2891
AGCATAGATG AACCTTACC GTGAC																2917

15

16

【0039】

【配列番号：3】配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to genomic DNA

フラグメント型：中間部フラグメント

*起源：ブタ

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..381

特徴を決定した方法：S

配列

ATG CAC CTC TCC CAG CTG CTG GGC TGC GCT CTG CTG CTC ACG CTC CTC	48
TGG CTC GGG CCC TCC GAA GGC AAG CCC GGA GCG CCG CCG AAG GTC CCT	96
CGA ACT CCG CCA GCG GAG GAG GTG GCT GAG CCC CAG GCT GCG GGC GGC	144
GCT CAG AAG AAG GGC GAC AAG ACT CCT GGG GGC GGT GGC GGC AAC CTC	192
AAG GGC GAC GGG TCT CGA CTG CTC CCG GAC CTG GCG GTG GAC ACC AAG	240
TCT CCG GCG GCG TGG GCG GCG CTT CTG CAC GAG CAC CCG AAC GCG CAC	288
AAA TAC AAA GGA GGC AAC AAG AAG GGT TTG TCC AAG GGC TCG TTC GGC	336
CTC AAA CTG GAC CCG ATC GGC TCC ATG AGC GGC CTG GGA TGT TAG	381

【0040】

【配列番号：4】配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to genomic DNA

フラグメント型：中間部フラグメント

※起源：ラット

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

30 存在位置：1..381

特徴を決定した方法：S

配列

ATG CAC CTC TCC CAG CTG ATC GGC TGT GCG CTG CTG CTC GCG CTA CTC	48
TCA CTC GGG CCC TCC GAA GGC AAG CCC GCG ACA CCA CCG AAG GTC CCG	96
AGA ACC CCG CCA GCG GAG GAG CTG GCA GAG CCC CAG GCA GCT GGT GGC	144
AAT CAG AAA AAG GGT GAC AAG ACT CCA GCG GCG GCG GGA GGC AAT CTC	192
AAG GGA GAC CGA TCG CGA CTG CTT CCG GAC CTG GGT GTG GAC ACC AAG	240
TCC CCG GCG GCG TGG GCT CCG CTT CTG CAC GAG CAC CCG AAC GCG CCG	288
AAA TAC AAA GGC GGC AAC AAG AAG GGC TTG TCC AAA GGC TCG TTT GGC	336
CTC AAG CTG GAC CCG ATC GGC TCC ATG AGC GGT CTG GGA TGT TAG	381

【0041】

【配列番号：5】配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATATGAGCTC ATGCACCTCT CCCAGCTGAT C	31
------------------------------------	----

【0042】

【配列番号：6】配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

☆トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：合成DNA

配列

TGCTGTGAC TAACATCCCA GACCGCTCAT	30
---------------------------------	----

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のCNPを用いて作成したCNP抗体を

用いたRIAにより測定したヒト脳中のCNP様活性を示すグラフである。

【図1】

